

DER BEITRAG DES STRATUM CORNEUM
ZUR HAUTOBERFLÄCHENFLUORESZENZ

Uta Holzer

1973

Aus dem Institut für Medizinische Balneologie und
Klimatologie der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Josef Lissner

Der Beitrag des stratum corneum zur
Hautoberflächenfluoreszenz

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfaßt und
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Uta Holzer
aus München

München 1973



Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Referenten: Dr.rer.nat.H.Pratzel
Prof.Dr.med.H.Drexel
Korreferent: Prof.Dr.med.J.Lissner
Dekan: Prof.Dr.med.W.Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 27. 3. 1973

MEINEN ELTERN

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. EINLEITUNG	1
A) Historische Einführung	1
B) Ein neuer Hautspektralfluorograph	
C) Bisherige Fluoreszenzuntersuchungen an der Hautoberfläche	1
D) Problemstellung	
II. DIE HORNSCHICHT ALS TEIL DER EPIDERMIS	3
A) Aufbau der Epidermis	3
B) Die Hornhaut	4
1. Abhängigkeit der Hornschichtdicke von der Lokalisation	4
2. Histologie und Morphologie	4
3. Physiologische Funktion und Resistenzfähigkeit	5
C) Stoffliche und chemische Zusammensetzung der Hornschicht	6
1. Die Lipide	7
a) Geschichtlicher Rückblick	7
b) Die Rolle der Lipide bei der Bildung der Zellmembranen	8
c) Zusammensetzung der Lipide nach neuerer Auffassung	9
2. Die wasserlöslichen Inhaltsstoffe der Hornhaut	10
a) Aminosäuren	10
b) Zucker-Aminosäureverbindungen	14
D) Die UV-Absorptionsspektren der Hornschicht- substanzen	15
a) der Aminosäuren	15
b) der Hornhautlipide	17

	Seite
III. MATERIAL UND METHODIK	19
A) Der Hautspektralfluorograph	19
1. Technische Erläuterungen	19
2. Kombinierte Fluoreszenz-Excitationsspektren	21
B) Methodik	22
1. Isolierung des stratum corneum conjunctum	22
2. Isolierung des stratum corneum in toto	22
3. Aufbewahrung des Hornschichtmaterials	22
4. Einspannen des Häutchens zur Messung	22
5. Die Aufnahme von kombinierten Fluoreszenz- Excitationsspektren	22
6. Behandlung der Hornhaut mit verschiedenen Solventien	25
IV. VERSUCHSERGEBNISSE	
A) Fluoreszenzmessungen von unbehandelter, UV-be- strahlter und hornhautfreier Haut am Rücken	26
B) Fluoreszenzmessungen von mit Solventien behandelter Hornhaut	29
C) Spektren von wassereluierten Hornhaut bei verschiedenen apparativen Einstellungen	32
V. DISKUSSION DER ERGEBNISSE	34
VI. ZUSAMMENFASSUNG	44
VII. LITERATUR	47

IM TEXT VERWENDETE ABKÜRZUNGEN:

AS	Aminosäuren
Exc	Excitation
Extr	Extraktion
Flu	Fluoreszenz
HH	Hornhaut
KFES	Kombinierte Fluoreszenz-Excitationsspektren
RFI	Relative Fluoreszenz-Intensität
UCS	Urocaninsäure
UV	Ultraviolett
WL	Wasserlösliches

VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN:

Abb.I	Anteil der freien AS am WL (nach PRATZEL)
Abb.II	Das Absorptionsspektrum eines wässrigen Hornhauteluats
Abb.III	Das Absorptionsspektrum von Hornschichtlipiden
Abb.IV	Der Hautspektralfluorograph (Ansicht von oben)
Abb.V	Untersuchter Schnitt durch die Fluoreszenz-landschaft der Hornhaut
Abb.VI	RFI-Unterschiede nach WL und Lipidextraktion

I. EINLEITUNG

A. Historische Einführung

Schon im 17. Jahrhundert erkannte der päpstliche Leibarzt, Anatom und Botaniker Marcello Malpighi die Bedeutung von Aufbau und Funktion der Epidermis. Deren Natur erschöpfend zu erforschen, fehlten ihm weitgehend die uns bekannten Untersuchungsmöglichkeiten.

Daß die wichtige Aufgabe der Haut, als Barriere gegen die Außenwelt zu fungieren, im stratum corneum ausgeführt wird, ist erst in der zweiten Hälfte unseres Jahrhunderts eindeutig klar geworden. Seitdem werden Struktur, Inhalt, Funktionen und Reaktionen der menschlichen Hornschicht auf vielerlei Arten untersucht.

Durch Messung der Fluoreszenz stoffwechselaktiver Verbindungen konnten in den letzten Jahren wichtige Fragen zu den biochemischen Vorgängen in der intakten Zelle geklärt werden. Um auch die menschliche Körperoberfläche mit dieser neuen Methode zu untersuchen, fehlten bisher die apparativen Voraussetzungen. Bei den handelsüblichen Spektralfluorometern konnten interessierende Hautareale nicht in den Strahlengang gebracht werden.

B. Ein neuer Hautspektralfluorograph

Aus diesem Grunde hat H. PRATZEL einen speziellen Hautspektralfluorographen mit flexiblem Strahlengang entwickelt. Mit diesem können im Sichtbaren und UV Fluoreszenz- und Remissionsmessungen an der Hautoberfläche und Absorptionsmessungen von Hauteluat, die mit der Haut in Kontakt stehen, durchgeführt werden.

C. Bisherige Fluoreszenzuntersuchungen an der Hautoberfläche

Mit diesem neuen Hautspektralfluorographen untersuchte A. ATZINGER im Rahmen seiner Dissertationsarbeit die Fluoreszenzeigenschaften der Hautoberfläche. Ihn interessierten vor allem die Veränderungen der relativen Fluoreszenzintensität (RFI), die nach lokalen Behandlungen der Haut mit

Substanzen wie z.B. Wasser, Histamin, Adrenalin u.a. auftraten. Nach Entfernen der Hornzellagen mit Tesafilmabrisen konnte er auch Fluoreszenzspektren der tieferliegenden Epidermisschichten aufzeichnen. Das Fehlen der Hornhaut beeinflusste die RFI entscheidend.

Da ich, was den Problemenkreis und die Meßtechnik betraf, Atzingers Nachfolge antrat, versuchte ich da fortzufahren, wo er von Anfang an experimentelle Lücken gelassen hatte. Offengeblieben war die Frage, inwieweit die einzelnen Epidermisschichten an der Gesamtfluoreszenz der Hautoberfläche beteiligt waren.

D. Problemstellung

Der Effekt, den Atzinger mit dem Ablösen der Hornschicht erzielt hatte, brachte uns auf den Gedanken, zunächst entweder das Barrierehäutchen, das den unteren zusammenhängenden Teil der Hornschicht darstellt, oder die Hornhaut in toto zu isolieren. Auf diese Weise mußte es möglich sein, die Fluoreszenzeigenschaften des stratum corneum festzulegen und sie qualitativ mit denen der gesamten Epidermis zu vergleichen. Der RFI-Unterschied mußte durch die Substanzen der Hornhaut bedingt sein.

Um die ursächliche Wirkung der dort bekannten Stoffgruppen auf die RFI auseinanderhalten zu können, sollten diese von der Hornschicht getrennt werden. Eine Änderung der RFI nach dem Herauslösen gewisser Substanzen konnte Hinweise auf deren Fluoreszenzbeteiligung geben.

In erster Linie handelte es sich bei diesen Substanzen um die wasserlöslichen Stoffe und die Lipide, die nach STÜTTGEN 23 % bzw. 20 % der Hornschicht ausmachen. Nach deren Extraktion bleiben ca. 55 % Unlösliches zurück. Über die wasserlöslichen Inhaltsstoffe hat PRATZEL in den letzten Jahren umfangreiche Untersuchungen angestellt. Er fand die freien Aminosäuren im Wasserlöslichen zu 40 %, die Urocaninsäure zu 2,3 % vertreten.

Für meine Arbeit wurde geplant, die Inhaltsstoffe des stratum corneum mit Lösungsmitteln in bestimmter Reihenfolge zu extrahieren und den Einfluß dieser Solventienbehandlungen auf die RFI mit dem Hautspektralfluorographen

zu erfassen. Um diskutieren zu können, welche nicht fluoreszierenden Substanzen die Fluoreszenzintensität verändern, sollten auch die Absorptionskurven der Hornhautextrakte am Spektralphotometer aufgezeichnet werden.

Ein kurzgefaßter Überblick, der Morphologie, Histologie und Physiologie der Hautoberfläche und der Hornschicht beinhaltet, soll das Verständnis für die folgenden Versuche erleichtern.

II. DIE HORNSCHICHT ALS TEIL DER EPIDERMIS

Zunächst möchte ich die natürliche Lage der Hornhaut im Gesamtgefüge der Oberhaut darstellen, aus der sie für Versuchszwecke isoliert wurde.

A. Aufbau der Epidermis

Grob betrachtet besteht die Haut aus einem epithelialen und einem bindegewebigen Anteil (JORDAN). Das geschichtete, an der Oberfläche verhornende Plattenepithel bildet die Oberhaut oder Epidermis, die sich aus der Basalschicht bzw. dem stratum basale, der Stachelzellschicht bzw. dem stratum spinosum und der Hornschicht, dem stratum corneum zusammensetzt. Zwischen stratum spinosum und stratum corneum liegt das bei starker Hornbildung am deutlichsten erkennbare stratum granulosum oder die Körnerschicht, die ihren Namen den stark lichtbrechenden, aus Keratohyalin bestehenden Körnchen verdankt. Als stärker lichtbrechendes, sich jedoch nicht anfärbendes schmales Band kann oberhalb der Körnerschicht das stratum lucidum sichtbar werden (JORDAN).

Die Epidermis ist gefäßlos; ihre Ernährung erfolgt durch Diffusion über Saftspalten von den Papillen aus, die als zapfenförmige Fortsätze von der angrenzenden Lederhaut aus in die Epidermis hineinragen und mit Kapillarschlingen versorgt sind,

B. Die Hornhaut

Alle Epidermiszellen unterliegen dem ständig ablaufenden Verhornungsprozess, dessen Phasen im Schichtenbild der Epidermis zum Ausdruck kommen. Endprodukt dieses Prozesses ist die Hornschicht, an der man zwei Schichten unterscheidet. Die oberen Hornzellagen werden als stratum disjunctum bezeichnet, die unteren Lagen, deren Zellen einen festen Verband darstellen, als stratum conjunctum oder pars conjuncta zusammengefaßt. Für das stratum conjunctum prägte SZAKALL den funktionellen Begriff "Barriere".

1. Abhängigkeit der Hornschichtdicke von der Lokalisation

Je nach Lokalisation ist das stratum corneum verschieden stark ausgebildet. Am Rücken, von dem das Versuchsmaterial hauptsächlich bezogen wurde, beträgt seine Dicke ca. 6 - 40u, kann aber an mechanisch besonders beanspruchten Stellen wie den palmo-plantaren Regionen einen Durchmesser von 80u und mehr erreichen. Im Gesicht entspricht ihre Stärke etwa der der isolierten pars conjuncta, 10u (SPIER, PASCHER). Am Vorderarm, von dem ich mehrfach Barrierehäutchen zu gewinnen versuchte, fand MARZULLI 1963 eine Hornschichtdicke von 37u, von denen das stratum conjunctum 14,5u ausmachte.

Da die Hornschicht trotz ihrer minimalen Stärke dem Organismus einen ausreichenden Schutz gegen schädliche Umwelteinflüsse zu bieten vermag, muß der Grund dafür im festen Zusammenhalt ihrer Zellen liegen. Eine Erklärung für die außerordentlich stabile Kohärenz, für die ich später einige Beispiele anführen möchte, ist im Aufbau der Hornzellen und der Art ihrer Verspannung zu finden.

2. Histologie und Morphologie

Nach älterer Auffassung bilden die schon von UHNA färbereich dargestelltten Tonofibrillen der Hornzellen einen Verband mit den interzellulären Desmosomen, die als Brückenfasern im stratum spinosum besonders deutlich sind.

Auf diese Weise entsteht ein System ineinander verschränkter Faserbögen.

Auch nach neueren Ansichten ist die Kohärenz des epidermalen Zellgefüges im wesentlichen durch die Desmosomen bedingt. Diese stehen jedoch in keinem direkten Zusammenhang mit den intrazellulären Tonofibrillen, sondern bilden offenbar Strukturen, die mit den Membranen nicht irreversibel verschmolzen sind. Diese relative Beweglichkeit der Strukturen scheint auch erforderlich, wenn man bedenkt, welche Scher- und Spannkkräfte mit dem Verschieben des Zellgefüges verbunden sind und beim Aufsteigen der Basalzellen an die Peripherie irgendwie abgefangen werden müssen. Ein starrer Desmosomenapparat müßte während des Verhornungsablaufes dauernd gesprengt werden.

Einige Beispiele sollen dazu beitragen, die vor teilhaften Auswirkungen der Hornzell-Kohärenz anschaulich werden zu lassen.

3. Physiologische Funktion und Resistenzfähigkeit

Der Schutz vor Austrocknung des Organismus ist die wichtigste Funktion der menschlichen Hornhaut. Eine intakte Hornschicht läßt täglich nur eine wenig variable Menge von Wasser in Form der perspiratio insensibilis nach außen gelangen. Diese Menge, ca 400 g/ die, steigt auf das 50fache an, falls die Hornhaut entfernt ist.

Solange die Struktur der Hornhaut nicht sichtbar zerstört ist, verändern weder 1n NaOH, 6molarer Harnstoff noch kochendes Wasser die ursprüngliche Wasserdampfpermeation (JACOBI). Ätherbehandlung läßt sie um das 4-9fache, Azetonbehandlung mit anschließender Hexanextraktion auf das 75fache ansteigen, ohne daß sich histologisch Alterationen feststellen lassen (JADASSON und SCHAAP). Diese in der Literatur beschriebenen Versuche gaben Hinweise, welche Reihenfolge bei der Wahl der Extraktionsmittel am sinnvollsten wäre.

Nach Extraktion der 23 % wasserlöslichen Anteile dehnt sich die Hornschicht in ihrer Fläche zwar um 10-20 %

aus, zeigt im übrigen jedoch keine Veränderung ihrer Strukturfestigkeit (LEONHARDI, LÖNNER, GÜRENCI, SCHMIDT).

Den epidermogenen Lipiden kommt eine fundamentale Bedeutung für die Hornschichtresistenz zu, weil sie sowohl die Matrix des Interzellularzementes liefern als auch Hauptbestandteile der Zellmembranen darstellen. Daher ist eine Lipidextraktion wegen der danach herabgesetzten Kohärenz und Resistenz der Hornschicht erst zum Schluß der Versuchsreihe vorzunehmen.

Wird die Hornschichtdicke durch übereinander angelegte Tesafilmabrisse reduziert, steigt die Wasserdampfpermeation an, was möglicherweise auch auf eine verminderte Kohärenz durch die Zerrung der pars conjuncta zurückzuführen ist (RASSNER). Denn durch die Abrisse oberer Hornschichtanteile werden auch die physikalischen Eigenschaften der Barriere, wie Szakall die pars conjuncta der Hornschicht nannte, deutlich verändert.

Ebenfalls nach Abrissen mit Klebestreifen steigt die Mitosequote auf das 20fache an, wie PINKUS beschreibt. Die Regenerationsdauer der Hornzellen richtet sich nach der Stärke des gesetzten Reizes. Reaktive Hornschichtverdickungen an Körperstellen, die mechanisch besonders beansprucht werden oder über längere Zeit UV-Strahlung ausgesetzt sind, kennt man zum Teil aus eigener Erfahrung. Hier zeigt sich die Anpassungsfähigkeit der Epidermis an die verschiedensten Umweltsreize.

Damit möchte ich die Beobachtungen und Erfahrungen, die bis jetzt über die Hornhaut zusammengetragen wurden und von denen ich nur soweit berichtete, wie es für diese Arbeit interessierte, abschließen und mich mit der chemischen Zusammensetzung der normalen Hornschicht befassen.

C. Die stoffliche und chemische Zusammensetzung der Hornschicht

Da das isolierte stratum corneum das Versuchsmaterial dieser Arbeit darstellt, interessieren Überlegungen

zur Art und Weise seiner Entstehung. Forscht man in dieser Richtung nach, so findet man Untersuchungsergebnisse von zahlreichen Wissenschaftlern, die sich auf diesem Gebiet hervorgetan haben. Die chemisch ausgerichteten Studien über den Verhornungsablauf der Epidermis und über die Zusammensetzung der toten Hornschicht sind bis ins letzte Jahrhundert zurückzuverfolgen. Das heutige Wissen basiert auf längst gewonnenen Erkenntnissen und auf Forschungen in neuerer Zeit. Über die wichtigsten Schritte in der Erforschung des Verhornungsprozesses soll ein kurzgefaßter, historischer und sachlicher Überblick gegeben werden, in dem besonders die Rolle der Lipide hervorgehoben wird.

1. Die Lipide

a. Geschichtlicher Rückblick

Schon 1890 vertrat LIEBREICH die Ansicht, daß der Keratinisierungsprozess und die Veresterung des Cholesterin eng miteinander verknüpft seien. In Eleidin und keratohyalin glaubte er die Vorstufen des Cholesterinesters gefunden zu haben. Heute wissen wir, daß Keratine Proteine sind, die wie alle Proteine aus Aminosäuren bestehen. 1949 veröffentlichte SOBEL in New York einen Artikel über das Vorkommen von Squalen in der menschlichen Hautoberfläche. 1957 konnte BLOCH anhand von Isotopenversuchen beweisen, daß Squalen als Zwischenprodukt bei der Cholesterinsynthese auftritt. Hier erhob sich die Frage, warum die Entwicklung in manchen Fällen bereits nach Erreichen der Squalenstufe stehenblieb. Es wurde vermutet, daß die Talgdrüsen nicht das vollständige Enzymsystem für die Cholesterinsynthese enthielten. Tatsächlich stellte sich bei späteren Untersuchungen heraus, daß nur die Talgdrüsen enthaltenden Schichten der Epidermis Squalen produzierten.

1959 entdeckte SWANBECK, daß die Proteinfibrillen einer normalen Hornschicht von einer 80 Å dicken Lipidschicht umgeben sein müssen, damit ihre regelrechte Funktion gewährleistet ist. Zusammen mit FURTHEDAL und THYLLÉN.

wies er nach, daß diese Lipidhülle bei abnormer Keratinisierung verändert auftritt.

In den letzten Jahren wurden Versuche mit Triparanol, genannt MER 29, angestellt, das durch Blockierung der Reduktion von Desmosterol die Cholesterinsynthese verhindert. Folge war die Manifestation eines schweren ichthyosisähnlichen Krankheitsbildes und beträchtlicher Störungen der Haarkeratinisierung (MERGER). Dies Versuchsergebnis beweist deutlich, wie eng die Lipidsynthese mit der Verhornung zusammenhängt.

1932 analysierte KOOYMAN im Äthereluat von Palmar-epidermis Phospholipide, freies und verestertes Cholesterin und Fettsäuren. Für die Basalzellschicht und das stratum corneum gab er folgende Konzentrationen an (Chol. = Cholesterin, BS = Basalzellschicht, HS = Hornschicht):

Phospholipide		Gesamt-Chol.		Freies Chol.	Fettsäuren
BS	2,62 %	1,56 %	davon 98,2 %	3,94 %	
HS	0,14 %	0,73 %	-	2,87 %	

Auffallend ist die gewaltige Abnahme an Phospholipiden, sobald eine lebende Zelle vollständig keratinisiert ist. Bemerkenswert ist auch, wie sich das Verhältnis von Phospholipid zu Gesamt-Cholesterin ändert. Von der Basalzellschicht bis zur Peripherie sinkt es von 1,8 auf 0,2 ab.

b. Die Rolle der Lipide bei der Bildung der Zellmembranen

Da nach REINERTSON und WHEATLEY (1959) ein Phospholipidmolekül das zweifache Gewicht eines Cholesterinmoleküls hat, liegt in der Basalzellschicht das molare Verhältnis von Phospholipiden und Cholesterin in der richtigen Größenordnung zur Bildung von Phospholipid- und Cholesterinkomplexen vor. Diese Komplexe sind Voraussetzung für den Bau von Zellorganellmembranen. Eine Abnahme der Phospholipide bei fortschreitender Keratinisierung hat die

Zerstörung der bereits erwähnten internen Membranen zur Folge. Diese wiederum zieht den Untergang der Zellorganellen nach sich. Im stratum granulosum kann man noch einige spärlich verteilte, allerdings schon nicht mehr funktions-tüchtige Mitochondrien entdecken, im stratum lucidum und corneum sind keine mehr auffindbar.

Nach Arbeiten von MATOLTSY (1962), ZELICKSON und HARTMANN (1962) scheint sich das endoplasmatische Retikulum im stratum lucidum aufzulösen, während der Nucleus, der Golgiapparat und die Zentriolen schon in den tieferen Schichten verschwinden. Da in den oberen Epidermisschichten ein hoher Esterasegehalt auffällt, liegt die Schlußfolgerung nahe, daß diese Enzyme durch Angriff auf die Lipide die Organellenmembranen auflösen. Zur gleichen Zeit könnte aus den freien Cholesterin, das bisher in den Phospholipid-komplexen gebunden war, verestertes entstehen.

Die äußeren Zellmembranen, die ebenfalls reich an Lipiden sind, lösen sich dagegen nicht auf. Sie verdicken sich durch Anlagerung eines chemisch extrem resistenten interzellulären Zementes (MERCER 1961) und bilden in der Hornschicht die hochwirksame Lipidbarriere. Der Schwund der Zellorganellen scheint die Voraussetzung dafür zu sein, daß die Zelle austrocknen und die flache kompakte Form einer späteren Hornzelle annehmen kann.

c. Die Zusammensetzung der Hornschichtlipide nach neuerer Auffassung

Wie hiermit gezeigt, haben die Lipide zweierlei Entstehungsmöglichkeiten, die verhornende Epidermis und die Talgdrüsen. Nach SPIER und PASCHER beinhaltet der glandogene Oberflächentalg in den obersten Hornzellagen rund ein Drittel freie Fettsäuren, ein Drittel mit Glycerin oder Wachsalkohol veresterte Fettsäuren und ein Drittel Unverseifbares. Die glandogenen Lipide werden von SPIER zu den sofort löslichen "klassischen" Lipiden gerechnet.

WAHL gibt den Cholesteringehalt der Hornschicht mit 90 % an, die restlichen 10 % der Lipide bilden seinen

untersuchungen nach die Fettsäuren. HERRMANN und Mitarbeiter weisen der pars conjuncta den größten Lipidgehalt zu, nämlich zwei Drittel bis drei Viertel der Hornschicht. Ihren Angaben nach liegt das Cholesterin zu gleichen Teilen frei und verestert vor.

CARRUTHERS fand 1962 folgende Lipidzusammensetzung in der Hornhaut:

Gesamtlipide	Cholest.	Phospholipide	Wachse	Freie Fettsäuren
8,72 %	1,01 %	0,78 %	2,21 %	2,09 %

Zu den freien Fettsäuren rechnet er gesättigte und ungesättigte Triglyceride, zu den Sterinen zählt er freies Cholesterin, Squalen und andere Sterine. Den Ursprung von Cholesterin nimmt er in der verhornenden Epidermis an, während Squalen, die freien Fettsäuren, die Glyceride und die Wachse seinen Angaben nach aus den Talgdrüsen stammen.

2. Die wasserlöslichen Inhaltsstoffe der Hornschicht

a. Die Aminosäuren

Den Hauptbestandteil des wasserlöslichen in der Hornhaut stellen die Aminosäuren dar. Im folgenden Überblick werde ich auf ihre wichtigsten Vertreter näher eingehen, bei denen aber, die in diesem Rahmen eine weniger große Rolle spielen, mich darauf beschränken, ihre Konzentrationen im stratum corneum tabellarisch festzuhalten. Damit bei der näheren Betrachtung einzelner Stoffgruppen die Übersicht über den Hornschichtinhalt nicht verloren geht, möchte ich ihn hier kurz wiedergeben.

Nach STÜTTGEN machen die Skleroproteine oder Struktureiweiße 50 %, die wasserlöslichen Stoffe 25 %, die Lipide 20 %, und Wasser 7 % des stratum corneum aus. 50 bis 55 % sind unlösliche Anteile. Das Konkeratin hat PASCHER

als den unlöslichen Teil nach Wasser - und Lipidextraktion definiert. UMLA unterscheidet das Keratin A als hartes und widerstandsfähigstes Hornprodukt von dem schon in der Kälte in verdünnten Alkalien löslichen Keratin B.

Die harte oder weiche Beschaffenheit des Keratins hängt von der Anzahl der stickstoffendständigen Aminosäuren ab. Im harten Keratin überwiegen die Aminosäuren Threonin, Valin und Glycin, im weichen Keratin wird relativ mehr Serin aufgefunden. Durch Einlagerung von Schwefelproteinen, z.B. Methionin und Cystin, wird bei der Verhornung eine Skleroproteinverfestigung erreicht. Methionin und Cystin sind die einzigen Aminosäuren, die in der Epidermis nur in gebundener Form vorkommen und nicht wie alle anderen als freie Aminosäuren nachgewiesen werden können.

Nach MÜTING, LANGHOF und v.WORTMANN gelten für das stratum corneum folgende Aminosäuren-konzentrationen verglichen mit dem Aminosäuregehalt der ganzen Haut:

	H o r n h a u t		G e s a m t h a u t	
	g % N	g % Eiweiß	g % N	g % Eiweiß
Asparaginsäure	0,49	4,7	0,55	5,2
Glutaminsäure	1,25	13,2	1,26	13,3
Lysin	1,50	7,9	1,31	6,9
Arginin	1,42	4,3	1,09	3,3
Histidin	0,78	2,9	0,49	1,8
Tyrosin	0,28	3,7	0,12	1,6
Tryptophan	0,34	2,5	0,16	1,2
Phenylalanin	0,61	7,1	0,60	7,0
Prolin	0,79	6,6	0,95	7,9
Cystin	1,10	9,1	0,30	2,5
Methionin	0,18	2,0	0,17	1,8
Leucin	1,11	10,2	0,96	8,8
Valin	0,80	6,7	0,76	6,3
Glycin	0,70	3,7	1,60	8,1
Alanin	1,10	6,9	1,14	7,1
Serin	1,08	8,3	1,12	8,6
Threonin	0,67	6,0	0,62	5,6

Die Aminosäuren Serin, Glycin und Citrullin stellen in der normalen Hornschicht rund die Hälfte aller freien Aminosäuren dar. Nach autoradiographischen Befunden sind Serin, Glycin und Arginin sowie Histidin bevorzugte Bausteine der Skleroproteine, die im stratum granulosum zum Keratohyalin, der Vorstufe des Keratins, synthetisiert werden.

Aus diesem keratohyalinständigen Histidin wird die Entstehung der Urocaninsäure (UCS) angenommen, die erstmals im Jahre 1786 von Jaffe aus Hundeharn isoliert wurde (SCHWARZ, KLOSS).

1955 identifizierten ZEMISEK und KRAL die UCS im menschlichen Schweiß, wobei damals noch nicht an eine nicht-glanduläre Herkunft gedacht wurde. TABACHNIK konnte durch Untersuchungen an schweißdrüsenfreier Meerschweinchenhaut die epidermogene Herkunft der UCS sicherstellen.

SCHWARZ fand die UCS in der Hornhaut in einer Konzentration von 0,8 bis 2,3 % vor, bezogen auf wasser- und lipid-freies Material. PRATZEL's Angaben zum Urocaninsäuregehalt stimmen mit denen von Schwarz überein. Die UCS-Konzentration beläuft sich nach seinen Untersuchungen auf 2,3 %.

Die UCS ist bei Orthokeratose charakteristisch. Da Histidin ihre Muttersubstanz ist, müßte dieses bei vermindertem Anfall der UCS im Verhornungsmaterial kompensatorisch vermehrt auftreten (EDLBACHER und HEITZ).

In der Tat scheint zwischen dem Histidin- und dem UCS-Gehalt eine umgekehrte Proportionalität zu bestehen. Bei malignen Tumoren der Epidermis z.B. fehlen die UCS und die Histidase bei entsprechend höherem Gehalt an Histidin (LADLO). Auch bei Psoriasis ist die UCS im erkrankten Bereich der Hornschicht nicht nachweisbar, wie WHEATLEY und FARBER 1962, SCHWARZ 1965 feststellen konnten.

Beim Emporwachsen der Hornzellen soll sich nach SCHWARZ die energiereichere cis-UCS in die trans-UCS umlagern. An den obersten Hornzellagen der Hornschicht ist besonders in den Sommermonaten wieder vermehrt cis-UCS vorhanden (PASCHER). Weil durch UV-Strahlung aus der

trans-UCS die cis-UCS entsteht, wird angenommen, daß die intensivere Sonnenbestrahlung im Sommer dafür verantwortlich ist.

Bei ihren Untersuchungen der freien Aminosäuren, die mit durchschnittlich 40 % den Hauptteil des Wasserlöslichen ausmachen, gelang es SPIER und PASCHER, Tryptophan nachzuweisen. Auch RATTENHOFER fand in Hautkeratinen Tryptophan, außerdem beachtliche Tyrosin- und Phenylalaninmengen. PRATZEL stellt den Anteil der freien Aminosäuren am Wasserlöslichen folgendermaßen dar:

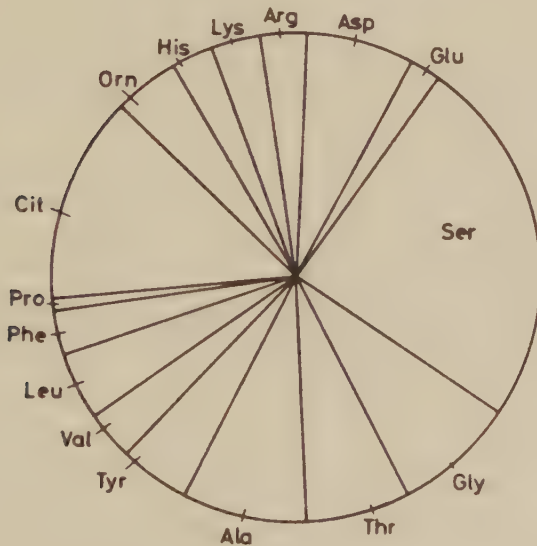


Abb.1: Anteil der freien AS am WL

b. Die Zucker - Aminosäuren - Verbindungen im stratum corneum

Am wäßrigen Eluat der Hornhaut fällt eine gelbliche Verfärbung auf, die durch zuckerhaltige Substanzgruppen bedingt sein soll. SZAKALL untersuchte diese Stoffgruppen und fand neben kohlenhydraten auch Kohlenhydrat-Aminosäurenkondensate. Als er natürlichen Eluaten Zucker hinzusetzte, stellte sich heraus, daß diese Zucker papierchromatographisch nicht mehr unverändert nachweisbar waren. Diese Tatsache erklärte er mit der Existenz gewisser Amadori- und Maillard-Verbindungen, die speziell in wasserarmem Milieu, wie es die Hornschicht bietet, aus freien Aminosäuren und Zuckern entstehen.

SPIER und PASCHER konnten durch die Orcin- und Bial-Reaktion 20 bis 50 mg Pentosen sowie 100 bis 200 mg % Hexosen nachweisen. Nach ihren Untersuchungen liegen nur 10 bis 30 mg % als freie Glukose vor, während freie Pentosen überhaupt nicht vorkamen.

Übereinstimmend wurde auch von vielen anderen Autoren festgestellt, daß in den wäßrigen Eluaten normaler Hornschicht Hexosen, Pentosen, Desoxyribose und Glucosamin vorhanden sind. Was die Bildung der Zucker-Aminosäuren-Kondensationsprodukte angeht, gehen diese Autoren konform mit der Ansicht von Spier, Pascher und Szakall.

D. Die UV-Absorptionsspektren der Hornschichtsubstanzen

Kurzwelliges Licht von z.B. 200 bis 280 nm wird bereits grÖßtenteils in der Hornschicht absorbiert, Strahlen ab der Wellenlänge 280 nm Überwiegend im corium und nur noch zu 4 bis 5 % im stratum corneum. Bei diesen wellenlängen fallen 7 % der Absorption auf die basalen Epidermisschichten (WITTELS, van HAM, HERZOG).

STÜTTGEN gibt die prozentuale UV-Transmission des stratum corneum, verglichen mit der Transmission des stratum Malpighii und der Cutis folgendermaßen an:

nm	stratum corneum	stratum Malpighii	Cutis
200	0	-	-
250	19	0/11	0
280	15	9	0
300	34	10/16	0
325	-	15	-
350	-	20	-
400	80	32/57	1
450	-	51	-

1. Die UV-Absorptionsspektren der Aminosäuren

CARRUTHERS schreibt den Aminosäuren 66 % der Absorption zu und gibt ihnen damit eine maßgebliche Rolle an der Fluoreszenzbeeinflussung der Hornschicht. Inwieweit die einzelnen Aminosäuren am Fluoreszenzgeschehen beteiligt sind, geht aus ihren Absorptionsbereichen hervor, die in nachstehender Tabelle aufgeführt sind (CRITICAL TABLES). Der Absorptionsbereich der Substanzen ist zum Langwelligen und Kurzwelligen hin durch die Wellenlängen begrenzt, an denen bereits bzw. noch 10 % des Absorptionsmaximums gemessen wurden. Die aromatischen Aminosäuren weisen in ihren Absorptionsspektren zwei Gipfel auf, den einen bei ca 220 nm.

Substanz	Absorptionsbereich	Maximum
Tyrosin	215-315 nm	270 nm
Phenylalanin	217-350 nm	270 nm
Tryptophan	227-335 nm	260-290 nm
Glycin	215-360 nm	280 nm
Leucin	215-335 nm	220 nm
Arginin	206-335 nm	217 nm
Lysin	215-335 nm	215 nm

In der folgenden Abbildung ist das Absorptionsspektrum eines wäßrigen Hornschichteluates dargestellt, das am Spektrophotometer aufgezeichnet wurde.

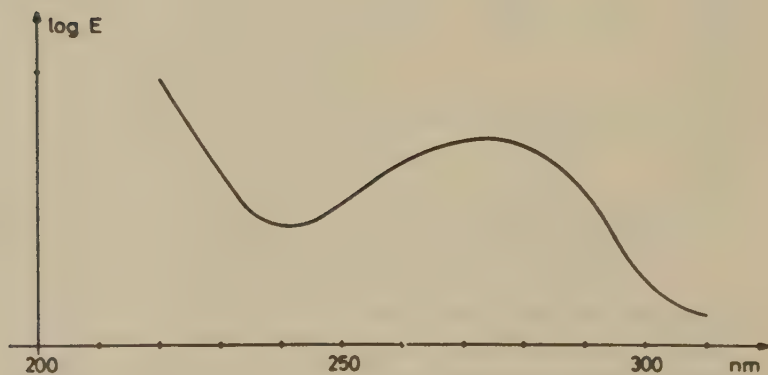


Abb. 2: Absorptionsspektrum eines wäßrigen Hornschichteluates, dargestellt als typische Farbkurve (log E gegen nm)

SZAKALL untersuchte die UV-Absorption wäßriger Extrakte der pars conjuncta und disjuncta. Er konnte zeigen, daß die Absorptionseigenschaften der Extrakte weder qualitativ noch quantitativ durch die in ihnen enthaltenen freien Aminosäuren erklärt werden kann. Aufgrund der Absorptionskurven kamen maximal zwei absorbierende Substanzen in Frage, die zwei Eigenschaften gemeinsam hatten: Sie waren in Wasser löslich, in Äther unlöslich.

Auch ZENISEK und KRAL fanden das UV-Absorptionsspektrum des wasserlöslichen in der Hornhaut nicht erklärbar mit dem Gehalt an aromatischen Aminosäuren wie Histidin, Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin. Angeregt durch die Arbeiten von Zenisek und Kral 1953 bewiesen SPIEL und PASCHER die Identität der ersten absorbierenden Substanz mit der Urocaninsäure; deren Absorptionskurve verlief parallel zu der des wäßrigen Hornhauteluates und zeigte die gleichen Maxima.

Als zweite Substanz nimmt SZAKALL eine der Urocaninsäure sehr verwandte Substanz an, da sie die gleiche pH-abhängige Verschiebung des Maximums aufweist wie die Urocaninsäure. Von SCHWARZ wurden die beiden Substanzen später als cis- und trans-Urocaninsäure identifiziert. Der Absorptionsbereich der Urocaninsäure liegt zwischen 220 und 310 nm, das Absorptionsmaximum bei pH 5,5 bei 265 nm (FRATZEL). Auch nach der These von ZENISEK und KRAL ist die Urocaninsäure als führendes UV-Chromogen anzusehen.

2. Das UV-Spektrum der Hornhautlipide

Das Absorptionsspektrum eines Lipidextraktes, der durch Dichlormethanbehandlung der Hornhaut am Vorderarm gewonnen wurde, weist sein Maximum bei der wellenlänge 310 nm auf.

In der nachfolgenden Abbildung ist das Absorptionsspektrum der "sofort löslichen Lipide" (SPIER) dargestellt, das mit einem Spektralphotometer gemessen wurde.

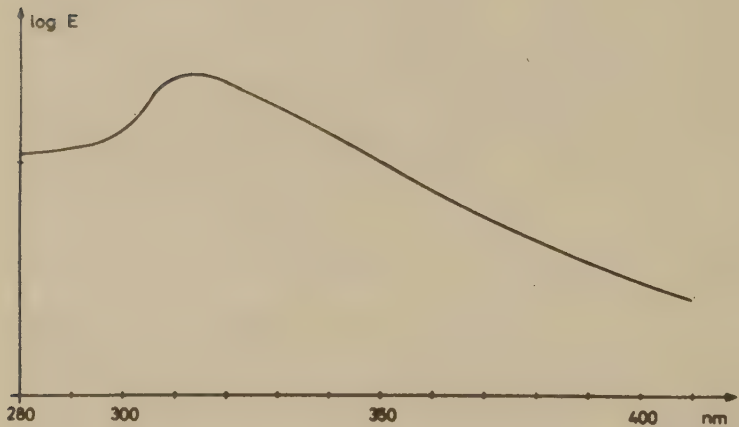


Abb. III: Das Absorptionsspektrum von Hornschichtlipiden, dargestellt als typische Farbkurve (log E gegen nm)

III. MATERIAL und METHODIK

A. Der Hautspektralfluorograph

Die Anwendung bzw. das Verstehen der Fluoreszenzmeßtechnik setzt gewisse Kenntnisse vom Aufbau und von der Funktion des Hautspektralfluorographen voraus. Aus diesem Grunde möchte ich einige wichtige Daten über den von FRATZEL entwickelten und beschriebenen speziellen Hautspektralfluorographen wiedergeben.

1. Technische Erläuterungen

Eine Ansicht von oben auf das Spektralfluorometer soll eine Vorstellung davon geben, wie die optischen Elemente auf einer Gußplatte von 87 x 195 cm untergebracht sind.

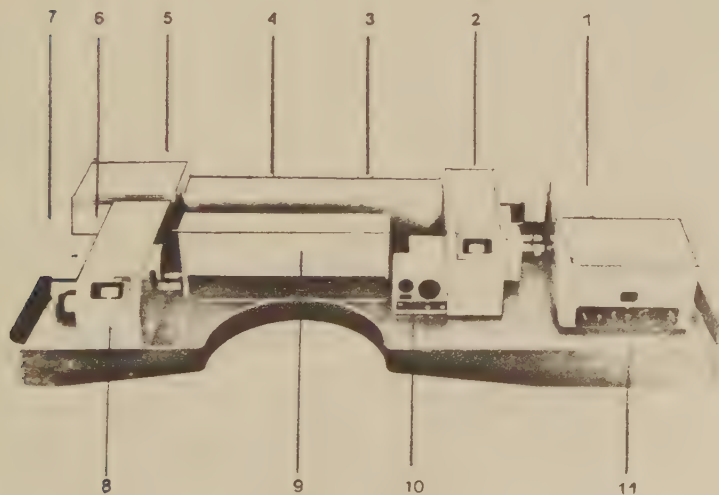


Abb.IV:Der Hautspektralfluorograph (Ansicht von oben.)

Erklärungen zur Abbildung des Hautspektralfluorometers:

1 = Xenonlampe, 2 = Monochromator I, 3 = Ulenkoptik für den Primärstrahlengang, 4 = Steuermultiplier, 5 = Steuergerät für Eintrittsspalt von Monochromator I, 6 = Küvettenkasten für Photometrie, 7 = Meßmultiplier, 8 = Monochromator II, 9 = Ulenkoptik für Sekundärstrahlengang, 10 = Antrieb für automatische Prismendrehung von Monochromator I, 11 = Stromversorgungsgerät für Wasserstoff- und Wolframlampen

Als Lichtquelle wurde eine Xenonlampe von 450 Watt verwendet. Die Strahlung wird durch zwei Monochromatoren geleitet, einen Anregungs- und einen Meßmonochromator. Beide sind zur Aufnahme von Spektren mit einem Antrieb zur automatischen Prismendrehung versehen. Die durch Lichtbogenschwankungen der Xenonlampe ungleichmäßige Anregungsenergie wird durch einen Photomultiplier, Typ 1 P 23, geregelt. Dadurch bleibt die Energie des Anregungslichtes im Wellenlängenbereich von 280 bis 400 nm nahezu gleich. Bei 470 nm weist der Multiplier seine maximale Empfindlichkeit auf, sodaß der Spalt von der Spaltautomatik bei dieser Wellenlänge maximal eng gestellt wird.

Zur Fluoreszenzmessung soll sich das Meßobjekt genau im Schnittpunkt der Strahlengänge befinden. Um dies zu erreichen, wird auf die Hautoberfläche von oben her ein mit entsprechenden Gewichten belegtes Küvettenrohr, das bei festen Meßobjekten durch einen Meßkopf ersetzt ist, senkrecht aufgesetzt. Dieses Küvettenrohr wird mittels einer Druckfeder manuell oder automatisch in die richtige Höhe justiert. Das Fluoreszenzoptimum wird beim Justieren vom Digitalvoltmeter abgelesen.

Um Anregungsspektren aufzunehmen, stellt man den Meßmonochromator auf diejenige Wellenlänge fest ein, die der Fluoreszenz der Meßsubstanz entspricht. Der im kurzwelligen gestartete Anregungsmonochromator durchläuft den gewählten Wellenlängenbereich.

Die Aufzeichnung der Spektren erfolgt an einem

XY-Schreiber. An der Y-Koordinate liegt die Signalspannung, an der X-Koordinate wird die Prismenstellung der Monochromatoren registriert.

2. Kombinierte Fluoreszenz-Excitationsspektren (KFES)

Außer den Anregungsspektren wurden von der isolierten Hornhaut kombinierte Fluoreszenz-Excitationsspektren (KFES) geschrieben. KFES stellen in einem Arbeitsgang Anregungs- und Fluoreszenzoptimum einer Substanz dar. Nach PRATZEL ist die Fluoreszenzeigenschaft einer Substanz nur in einem dreidimensionalen Spektrum mit den Koordinaten Fluoreszenzwellenlänge, Excitationswellenlänge und relative Fluoreszenzintensität (rFI) vollständig ausdrückbar. Um die Gipfel der Fluoreszenzberge, die in einer Landschaft aus der Ebene ragen, in einem zweidimensionalen Spektrum erfassen zu können, ist eine Einzelaufzeichnung der verschiedenen Spektren wie z.B. Excitations- oder Fluoreszenzspektren unerlässlich.

Da die Haut und die isolierte Hornhaut in ihren Spektren immer nur zwei Gipfel aufweisen, sieht PRATZEL bei diesen Substanzen die Möglichkeit, KFES zu schreiben. Dabei durchläuft der Meßmonochromator den Fluoreszenzbereich zu der Zeit, in der sich der Anregungsmonochromator im Absorptionsbereich des Meßgutes befindet. Weil bei der Transformierung der Anregungsstrahlung in Fluoreszenzlicht Energie verlorenght, wird der Fluoreszenzmonochromator im langwelligeren und energieärmeren Spektralbereich gestartet.

Bei KFES ist es nicht möglich, beide Gipfel exakt in ihrem Optimum zu erfassen. Wegen der besseren Übersicht und der Arbeitsvereinfachung ist diese Art der Spektren dennoch der einzelnen Aufzeichnung vorzuziehen, zumal es bei den von mir durchgeführten Messungen hauptsächlich um die relative Fluoreszenzintensität der Substanzen geht. Das KFES stellt mit dem ersten Peak die rFI maximal dar, während es mit dem zweiten Peak nicht hundertprozentig das Fluoreszenzmaximum erfaßt. Räumlich gesehen wird der Schnitt durch den zweiten Fluoreszenzberg nicht genau durch den Gipfelpunkt gelegt, sondern dicht daneben.

B. Methodik

1. Isolierung des stratum corneum conjunctum

Bei sieben Personen versuchte ich, nach der von Szakall empfohlenen Abrißmethode Barrierehäutchen, d.h. die zusammenhängenden Zellagen des stratum corneum, zu isolieren. Um für eine Fluoreszenzmessung geeignet zu sein, mußte das am Tesafilmstreifen haftende Häutchen ein Ausmaß von mindestens 2 x 5 cm haben. Da meine Versuchspersonen sich hauptsächlich in zentralbeheizten Räumen aufhielten, war ihre Haut für die Barrieregewinnung viel zu trocken. Aus diesem Grunde wurde an der vorgesehenen Abrißstelle, der distalen Vorderarmbeugeseite, eine feuchte Kammer durch ein locker aufgelegtes Pflaster geschaffen, die 24 Stunden einwirkte. Durch diese Maßnahme gelang es in einem Fall, ein zusammenhängendes Stück stratum corneum conjunctum von erforderlicher Mindestgröße abzureißen. Um Defekte zu vermeiden, die beim Ablösen vom Tesafilmstreifen leicht entstehen, wurde das Häutchen zuerst samt Tesastreifen in den Strahlengang gebracht und nach einigen Tagen, als es sich nach Austrocknung des Klebstoffs gut abziehen ließ, isoliert gemessen.

2. Isolierung des stratum corneum in toto

Ein definiertes Hautareal an einer Rückenhälfte der Versuchsperson wurde aus einer Entfernung von 50 cm mit dem UV-Licht einer quarz-quecksilberlampe von 500 Watt bestrahlt. Die Bestrahlungsdauer betrug 10 Minuten.

Nach 8 Tagen hatte sich die Hornhaut teilweise in kleinen Schuppen von ihrer Unterlage abgehoben. Diese teils stellenweise gelösten, teils noch locker aufsitzenden Schuppen waren die Ansatzpunkte für die Gewinnung möglichst großer Hornschichtstücke. Zum Abziehen der Hornhaut wurden zwei chirurgische Pinzetten verwendet.

3. Aufbewahrung des Hornschichtmaterials

Diejenigen Hornhautstücke, deren Größe und Qua-

lität für die Messungen ausreichte, wurden vorläufig auf
Vergläsern und Petrischalen glatt ausgebreitet und abge-
deckt im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Nach zwei Wo-
chen wurden sie in eine feuchte Kammer gebracht, wo sie
vor Austrocknung besser geschützt waren.

4. Einspannen des Häutchens zur Fluoreszenzmessung

Damit das Meßgut exakt gespannt und oberflächen-
glatt in den Strahlengang gebracht werden konnte, wurde
eine Metallvorrichtung mit ovaler Öffnung von ca. $1\frac{1}{2}\times 1$
cm Durchmesser konstruiert, über die die Hornhaut gespannt
und auf der sie mit einem dicken Gummiring befestigt wur-
de. Diese Halterung wurde mit Schrauben am Meßkopf fixiert,
sodaß auch nach den verschiedenen Behandlungen immer die
gleiche Stelle des Meßgutes in den Strahlengang gelangte.

5. Die Aufnahme von KFES

Wegen der einfacheren Technik wurden Excitations-
und Fluoreszenzspektren in einem Arbeitsgang dargestellt.
Erklärung sowie Vor- und Nachteile dieser Arbeitsweise
sind bereits ausführlich im Abschnitt "Der Hautspektral-
fluorograph" auf Seite 21 besprochen. Zu beschreiben bleibt
noch die Methode der Spektrenaufzeichnung.

Standardmessung:

Jeder Hornhautmessung ging eine Standardmessung
voraus. Dazu wurde ein fester Fluoreszeinstandard mit Hal-
terung am Meßkopf eingeschraubt. Die Monochromatoren, die
zur gleichen Zeit bei 280 nm (Anregungsmonochromator) und
315 (Fluoreszenzmonochromator) starteten, wurden an den
Wellenlängen 301 und 352 nm, wo sich das Maximum des er-
sten Peaks befindet, angehalten. Nach Höhenjustierung bis
zum Optimum wurde der maximale Ausschlag am Digivoltmeter
abgelesen. Die Monochromatoren liefen weiter bis zu den
Wellenlängen 406 und 500 nm, wo das maximale Signal des
zweiten Peaks erfaßt wurde.

Hornhautmessung:

Um Analogwerte zu den Standardwerten zu haben, wurden vor der Aufzeichnung der kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektren auf dem XY-Schreiber mittels Höhenjustierung die maximalen Peakausschläge bei 301/352 nm und 405/500 nm am Digitalvoltmeter erfaßt. Nachdem damit optimal höhenjustiert war, konnten beide Monochromatoren wieder zu ihrem Ausgangspunkt von 280 und 315 nm zurücklaufen. Von hier aus wurden beide Prismen gleichzeitig in Richtung rot gestartet; mit gewählter Geschwindigkeit durchliefen sie unter gleichzeitiger Aufzeichnung des Spektrums am XY-Schreiber den Wellenlängenbereich bis 500 nm (Anregungsmonochromator) und 900 nm (Fluoreszenzmonochromator).

Messung der Rückenhaut in vivo:

Acht Tage nach der UV-Bestrahlung wurden am Rücken der Versuchsperson, von dem die Hornhaut gewonnen wurde, Fluoreszenzmessungen durchgeführt. Dazu wurde der Proband auf der verstellbaren Liege gelagert und die interessierenden Hautareale unter das Küvettenrohr in den Strahlengang gebracht. Die Höhenjustierung mußte die Versuchsperson durch Atembewegungen selbst vornehmen, was auch gut möglich war, da sie die numerisch registrierten Ausschläge am Digitalvoltmeter bei den verschiedenen Inspirationsstellungen des Thorax ohne Lageveränderung selbst ablesen konnte. Bei Erreichen des optimalen Signals behielt die Versuchsperson die Stellung des Thorax unverändert bei, bis die bei den üblichen Wellenlängen gestarteten Monochromatoren den Wellenlängenbereich des zweiten Fluoreszenzgipfels durchlaufen hatten.

Aus den aufgezeichneten KFS wurden die Wellenlängen der Fluoreszenzmaxima für bestrahlte, unbestrahlte und hornhautfreie Rückenhaut entnommen. Bei weiteren Rückenhautstellen wurden an den bekannten Peakwellenlängen die Fluoreszenzmaxima gemessen. Da hierfür nur eine

sehr kurze Ruhigstellung des Thorax nötig war, konnten beliebig viele Hautstellen hinsichtlich ihrer Fluoreszenz-optima erfaßt werden.

6. Behandlung der isolierten Hornhaut mit Solventien

Mit Wasser:

Die unbehandelte Hornhaut blieb nach der ersten Fluoreszenzmessung im Metallring eingespannt und wurde so fixiert in aqua bidestillata eingehängt. Die Wasserelutionen dauerten von 16 bis 24 Stunden bei den verschiedenen Versuchsreihen. Zur Elution wurde ein Schälchen mit 10 ml Fassungsvermögen verwendet, das soweit aufgefüllt wurde, daß das Wasser von allen Seiten auf die Hornhaut einwirken konnte. Vor der Messung wurde das Häutchen an der Luft getrocknet und nachgespannt.

Mit Diäthyläther:

Im Anschluß an die Wasserelution wurden die Lipide des stratum corneum mit Diäthyläther extrahiert. Nach ca. 3 Stunden war das schnellflüchtige Lösungsmittel trotz Aufbewahrung im Exsiccator verdunstet. Das Häutchen blieb in der Metallvorrichtung eingespannt.

Mit Aceton

Nach der Ätherbehandlung wurde das Hornhautstück einer Acetonextraktion ausgesetzt. Fest eingespannt wurde es in das Lösungsmittel gehängt. Obwohl das Aceton durch Abdecken und Aufenthalt in einer feuchten Kammer weitgehend vor Verdunstung geschützt war, war die Extraktion wegen der hohen Flüchtigkeit von relativ kurzer Dauer.

Mit Aceton, dem Cholesterin zugesetzt war

Mit Essigsäure

Mit Ameisensäure

In einem Versuch wurde eine unbehandelte Hornhaut mit Aceton extrahiert, dem bis zur Sättigung Cholesterinkristalle zugesetzt waren. Nach anschließender Ätherextraktion wurde in Essig- und Ameisensäure extrahiert.

IV. VERSUCHSERGEBNISSE

A. Fluoreszenzmessungen von unbehandelter, UV-bestrahlter und hornhautfreier Rückenhaut in vivo

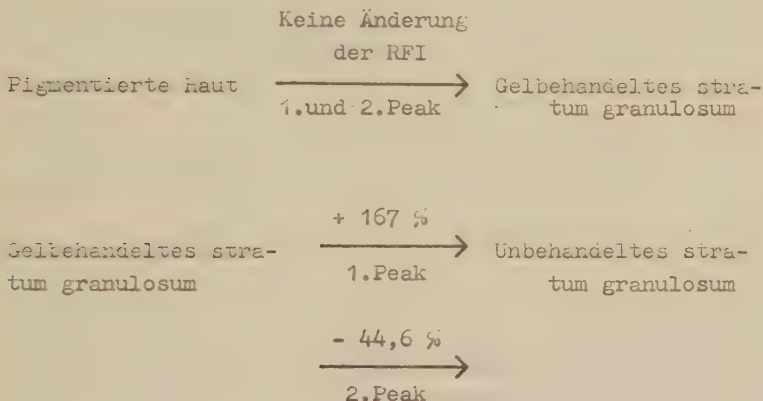
Von diesen Versuchen liegen verschiedene Meßergebnisse vor, die vor und nach der Hornhautisolierung von der Rückenhaut der Versuchsperson gewonnen wurden. Zu vergleichen ist die relative Fluoreszenzintensität (RFI) der KFES von unbehandelter Rückenhaut, UV-bestrahlter, stark pigmentierter und hornschichtfreier Haut (stratum granulosum), die teils unbehandelt blieb, teils mit Aristamidgel eingerieben wurde. Die Zahlen über den nachstehenden Pfeilen geben die prozentuale RFI-Änderung an, die anhand der Meßergebnisse unter Berücksichtigung der Standardmeßdaten errechnet wurden. Die RFI-Änderungen werden für den ersten und zweiten Peak gesondert aufgeführt.

Unbehandelte Haut	- 3,96 %	→	Pigmentierte Haut
	1. Peak		
	+ 3,04 %	→	
	2. Peak		
Pigmentierte Haut	+ 135 %	→	Hornschichtfreie Haut (stratum gra- nulorum)
	1. Peak		
	- 22 %	→	
	2. Peak		

Keine Änderung war beim Vergleich des Meßergebnisses der

unbehandelten Haut mit dem Ergebnis von gelbehandeltem stratum granulosum zu verzeichnen.

Die RFI von hochrotem, glänzenden und schmerzhaften stratum granulosum unterschied sich nicht von der RFI des stratum granulosum, das noch von den untersten Hornzelllagen überdeckt war.



Aristamidgel setzt sich folgendermaßen zusammen: 5 g 6-(Sulfanilamido)-2,4-dimethyl-pyrimidin werden mit Gelmasse zu 100 g Gel aufgefüllt.

Um die Fluoreszenzeigenschaften der verschiedenen Hautbezirke am Rücken der Versuchsperson aufgrund zahlreicher Meßwerte sicherer charakterisieren zu können, wurden acht Tage nach der UV-Bestrahlung zehn Hautstellen im gebräunten Bereich auf ihre RFI hin untersucht. Da der Thorax aus technischen Gründen während der Messung in Inspirationsstellung ruhiggestellt bleiben mußte, wurden keine zeitaufwendigen Spektren aufgezeichnet, sondern nur die Werte des ersten und zweiten Peaks vom Digitalvoltmeter abgelesen. Das Fluoreszenzoptimum wurde in diesem Fall durch Atemregulation ermittelt.

Bei diesen Messungen, denen wie immer eine Standardmessung vorausging, wurden für die beiden Peaks folgende Werte

registriert:	1. Peak	2. Peak
Standard:	0,77	1,53
Pigmentierte Haut:	1,00	1,38
	1,12	1,55
	1,03	1,45
	0,78	1,40
	0,90	1,47
	0,92	1,52
	0,98	1,52
	1,14	1,54
	1,02	1,72
	1,08	1,50

Am achten Tag nach der UV-Bestrahlung wurde die gelöste, sich von den tieferliegenden Epidermisschichten abgehobene Hornhaut wie beschrieben entfernt. zur fluoreszenz-messung wurde teilweise völlig freigelegtes, teilweise noch mit den untersten Hornzellagen bedecktes stratum granulosum herangezogen. Für den ersten und zweiten Peak wurden an zehn Hautstellen im Abriebereich folgende werte am Digitalvoltmeter abgelesen:

	1. Peak	2. Peak
Standard:	0,77	1,88
Abrißstellen:	1,60	0,64
	1,45	0,54
	1,20	0,54
	1,10	0,44
	1,14	0,30
	1,22	0,46
	1,33	0,46

	1. Peak	2. Peak
Standard:	0,77	1,88
Abrißstellen:	1,50	0,54
	1,74	0,58
	1,82	0,48

Innerhalb eines glänzenden, hochroten stratum granulosum-Bezirktes wurde für den ersten Peak ein Höchstwert von 2,4 gefunden.

B. Fluoreszenzmessungen von mit Solventien behandelter Hornhaut

In der folgenden Übersicht sind die Ergebnisse mehrerer Versuche dargestellt, die in ähnlicher Reihenfolge abliefen. Damit die Meßergebnisse nicht durch Geräteschwankungen verfälscht dargestellt wurden, waren die Peakhöhen der verschiedenen Fluoreszenzspektren der Hornschicht mit den entsprechenden Standarddaten zu dividieren. Zum Vergleich der gewonnenen Meßdaten werden diese Quotienten herangezogen. Die Ergebnisse werden für den ersten und zweiten Peak aller Versuche dieser Art getrennt aufgeführt.

Die Zahl über den Pfeilen gibt die prozentuale RFI-Veränderung an, die Beschreibung unter dem Pfeil bezieht sich auf die Art der Elutions- oder Extraktionsbehandlung des Hornschichtmaterials, die zu dieser RFI-Veränderung geführt hat. Die durch UV-Bestrahlung gewonnene Hornhaut (HH) wird vor den Extraktionen als wasserlöslichen und der Lipide als unbehandelte HH bezeichnet.

$$\begin{array}{rcl}
 0,760 & \xrightarrow{+ 343 \%} & 3,376 \\
 \text{Unbehandelte MH} & \text{H}_2\text{O-Elution} & \\
 & & \xrightarrow{- 7,65 \%} 3,136 \\
 & & \text{Acetonextraktion} \\
 & & \xrightarrow{- 7,34 \%} 1,552 \\
 & & \text{Ätherextr.}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 0,678 & \xrightarrow{+ 167 \%} & 1,817 \\
 \text{Unbehandelte MH} & \text{H}_2\text{O-Elution} & \\
 & & \xrightarrow{- 15,06 \%} 1,607 \\
 & & \text{Acetonextraktion} \\
 & & \xrightarrow{+ 68,57 \%} 1,709 \\
 & & \text{Ätherextr.}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 0,000 & \xrightarrow{+ 160 \%} & 1,773 \\
 \text{Unbehandelte MH} & \text{H}_2\text{O-Elution} & \\
 & & \xrightarrow{- 28,52 \%} 1,420 \\
 & & \text{Acetonextraktion} \\
 & & \xrightarrow{- 8,18 \%} 1,320 \\
 & & \text{Ätherextr.}
 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl}
 0,000 & \xrightarrow{+ 1,74 \%} & 0,269 \\
 \text{Unbehandelte MH} & & \\
 & & \xrightarrow{\text{keine Änderung}} 0,269 \\
 & & \text{Ätherextr.} \\
 & & \xrightarrow{+ 28,82 \%} 0,925 \\
 & & \text{Essigsäure-Extr.} \\
 & & \xrightarrow{- 69,25 \%} 1,727 \\
 & & \text{Acetonextraktion}
 \end{array}$$

Ergebnisse des ersten Peaks

	- 5,53 %	- 6,55 %	+ 100 %	- 4,54 %
0,671	→ 0,030	→ 0,597	→ 1,197	→ 1,145
Unbehandelte mit H ₂ O-Elution		2.H ₂ O-Elut.	acetoneextraktion	Atherextr.

	- 16,31 %	+ 21,33 %	+ 1,20 %
0,556	→ 0,478	→ 0,560	→ 0,587
unbehandelte mit H ₂ O-Elution		acetoneextraktion	Atherextr.

	- 44,48 %	+ 35,61 %	+ 98,75 %
0,838	→ 0,580	→ 0,750	→ 1,658
unbehandelte mit H ₂ O-Elution		acetoneextraktion	Atherextr.

	+ 7,19 %	keine Änderung	- 15,50 %	- 72,21 %
0,848	→ 0,909	→ 0,909	→ 0,787	→ 0,457
unbeh. mit Cholesterin-acetonextr.		Atherextr.	Essigsäure-Extr.	Ameisensäure-Extr.

Ergebnisse des zweiten Peaks

C. Spektren von wassereluierten Hornhaut bei verschie- den apparativen Einstellungen

Um über die Fluoreszenzbande von wassereluiertem stratum corneum aussagen zu können, wurden verschiedene Anregungsspektren geschrieben. Der Excitationsmonochromator wurde bei jeder messung bei 260 nm gestartet, der Fluoreszenzmonochromator blieb jeweils bei den wellenlängen 390, 400, 420, 440, 460 und 470 nm stehen. Die Lage der maxima ist in nachfolgender tabelle angegeben.

Fluor.-wellenlänge	Excit.-wellenlänge	Peakhöhe (mm)
390	266,8	58
400	266	66
420	264,2	76
440	262,7	90
460	261,5	93
470	261	92

Die optimale Fluoreszenz wurde bei einer anregung von 261,5 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 460 bis 470 nm gefunden.

Die Wiederholung des Experiments mit einer anderen wassereluierten Hornhaut führte zu den in untenstehender tabelle wiedergegebenen Werten. Die optimale Fluoreszenz lag in diesem Fall bei der Anregung 266,5 nm und einer Fluoreszenzwellenlänge von 400 bis 470 nm.

Fluor.-wellenlänge	Excit.-wellenlänge	Peakhöhe (mm)
360	278	42
380	275	58

Fortsetzung der umseitigen Tabelle:

Fluor.-wellenlänge	Excit.-wellenlänge	Peakhöhe (mm)
400	271	75
420	269	92
440	267	105
460	266,5	112
470	266	110

Bei einer letzten Messung dieser Art wurde die Art des zweiten Peaks einer wassereluierten Hornhaut registriert. Aufgezeichnet wurden in diesem Fall KFES. Der Excitationsmonochromator startete immer bei 280 nm, für den Fluoreszenzmonochromator wurden jeweils folgende Startwellenlängen gewählt: 290, 300, 310, 315, 325 nm. Die erhaltenen Fluoreszenzmaxima sind in nachfolgender Tabelle angegeben:

Fluor.-wellenlänge	Excitationswellenl.	Peakhöhe (mm)
415	383	34
420	365	39
425	350	37
430	345	35
440	337	33

Die optimale Fluoreszenz für die gemessene Substanzgruppe ergibt sich daraus etwa bei einer Anregung von 300 nm bei 420 nm.

V. DISKUSSION

Bevor ich zur Besprechung der Versuche und der Auswertung ihrer Ergebnisse komme, möchte ich einiges zu den Meßversuchen selbst sagen. Bei den von mir durchgeführten Messungen interessierte vor allem die Änderung der Fluoreszenzintensität, die nach den verschiedenen Behandlungen der Hornhaut auftrat. Aus diesem Grunde war es möglich, statt der Aufzeichnung reiner Fluoreszenz- und Excitationsspektren die für Vergleiche übersichtlicheren kombinierten Fluoreszenz-Excitationsspektren zu wählen.

Die Startwellenlänge der Monochromatoren wurde so eingestellt, daß zur gleichen Zeit der Anregungsmonochromator den Absorptionsbereich des Meßguts und der Meßmonochromator den Fluoreszenzbereich des Meßguts durchlief. Dabei muß man sich im Klaren sein, daß die Aufzeichnung beider Peaks in einem Arbeitsgang nicht auch das Intensitätsoptimum beider Gipfel erfaßte. Im KFE-Spektrum gibt der erste Peak das Fluoreszenzmaximum exakt an, der zweite Gipfel liegt dicht neben dem Maximum.

Am ehesten ist diese Tatsache zu verstehen, wenn man sich die Fluoreszenzgipfel der Spektren räumlich als Berge in einer Landschaft vorstellt (PRATZEL). Die Fluoreszenzberge der Hornhaut liegen dann in den Schnittpunkten der Anregungs- und Fluoreszenzmaxima. Räumlich betrachtet liegen diese Schnitte beim Start von Monochromator I bei 280 nm und Monochromator II bei 315 nm folgendermaßen: Der Schnitt durch den ersten Fluoreszenzberg geht genau durch den höchsten Punkt, während der zweite Gipfel von diesem Schnitt nicht exakt getroffen wird.

Um die diskutierten Ergebnisse dieser Arbeit anschaulich zu machen, werden sie in einer schematisch-räumlichen Darstellung zusammengefaßt. Abbildung 5 zeigt den untersuchten Schnitt durch die Fluoreszenzlandschaft der Hornhaut, in Abbildung 6 sind die durch Wasser- und Lipidextraktion bedingten KFI-Veränderungen aufgeführt.

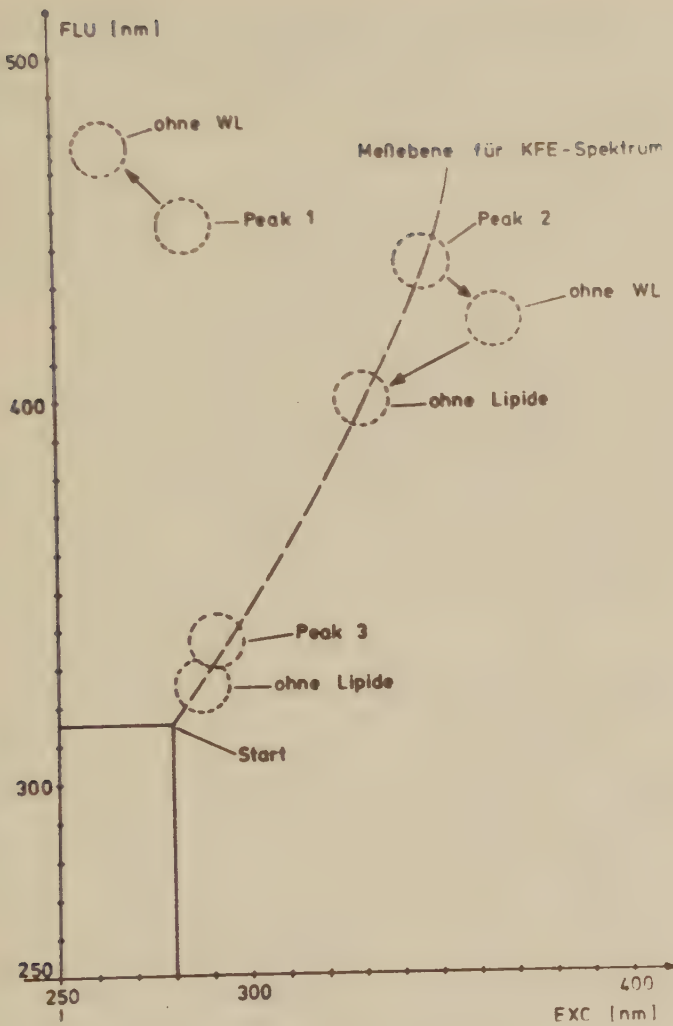


Abb. 5

Untersuchter Schnitt durch die Fluoreszenzlandschaft

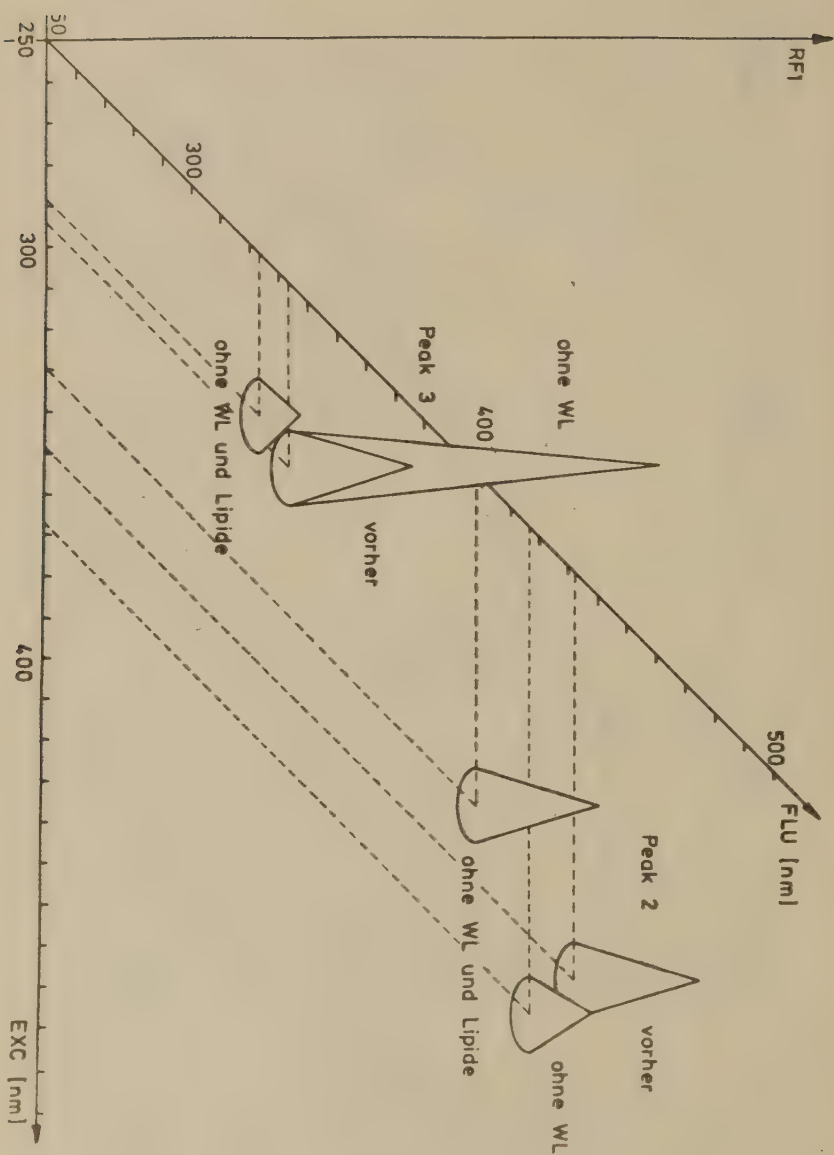


Abb. 6

RFI - Veränderungen nach
WL - u. Lipidextraktion

Das Zustandekommen des ersten Peaks im IRB-Spektrum der unbehandelten Hornhaut kann man sich folgendermaßen erklären: Bei einer Anregung bis 300 nm wird nach Angaben von STÜTTGEN fast die ganze anregende Strahlung von der Hornschicht absorbiert, d.h. sie enthält, verglichen mit den anderen Hautschichten, die meisten in diesem Anregungsbereich absorbierenden Substanzen. Ab der wellenlänge 300 nm nehmen diese Substanzen langsam ab, so daß bei einer Excitation bei 400 nm in der Hornhaut nur noch 20 % der Anregungsstrahlung absorbiert werden.

Den Hauptteil der absorbierenden Stoffe im stratum corneum stellen die Aminosäuren dar. Will man eine hypothetische Aussage über die an der Fluoreszenz beteiligten Substanzen im ersten Peakbereich machen, muß man unter den absorbierenden Aminosäuren zwischen denen unterscheiden, die absorbierte Anregungsstrahlung in Fluoreszenzlicht umwandeln und solchen, welche die absorbierte Energie in irgendeine andere Energieform umwandeln. Vertreter der ersten Gruppe sind vor allem die aromatischen Aminosäuren.

Die wellenlänge von 280 nm, bei der der Anregungsmonochromator gewöhnlich gestartet wurde, liegt noch im Bereich des Absorptionsmaximums von Tyrosin und Phenylalanin. Diese beiden Aminosäuren, die, bei 280 nm angeregt, intensiv bei 305 nm fluoreszieren, lassen in ihrer Fluoreszenzintensität bei Anregungsstrahlung gegen 295 nm stark nach. Tryptophan dagegen weist sein Fluoreszenzoptimum bei 350 nm auf, wenn es bei 295 nm angeregt wird.

Die Fluoreszenzeigenschaften dieser aromatischen Aminosäuren beruhen auf den Indol-, Phenol- und Benzolringen in ihren Verbindungen (UDENFALIND). Die Lichtausbeute hängt vom Ionisationszustand der Oh-Gruppen im Tyrosin und der NH-Gruppen im Tryptophan ab.

Die Fluoreszenz von proteinreichen Organen wurde bereits vor über 100 Jahren festgestellt. Erst die Ent-

wicklung von Photomultipliern ermöglichte auch quantitative Arbeiten über die Proteinfluoreszenz, deren Ergebnissen zu entnehmen war, daß nahezu alle Proteine im UV-Bereich fluoreszieren. Ausnahmen bildeten nur die Protamine, die keine aromatischen Aminosäuren enthalten.

Der Anteil der aromatischen Aminosäuren an der Proteinfluoreszenz ist jedoch verschieden groß. Nach ihren Fluoreszenzeigenschaften lassen sich die Proteine in zwei Typen einteilen (UDENFRIEND): Typ A enthält Tryptophan, Typ B nur Tyrosin und Phenylalanin.

Bei den Tryptophan enthaltenden Proteinen ist die Fluoreszenz vom Tryptophananteil abhängig, obwohl auch andere Aminosäuren in ihnen enthalten sind. Ein gutes Beispiel hierfür ist das menschliche Serumalbumin, bei dem auf einen Tryptophanrest 17 Tyrosinreste und 33 Phenylalaninreste kommen und dessen Fluoreszenzmaximum bei 342 nm dennoch beinahe dem des Tryptophan am nächsten liegt. WEBER fand 1961, daß die Hauptrolle an der Proteinfluoreszenz zwar dem Tryptophan, eine fast ebenso wichtige jedoch dem Tyrosin mit seinem Fluoreszenzmaximum bei 305 nm zufällt.

Bei den Proteinen vom Typ B, die kein Tryptophan enthalten, bestimmt das Tyrosin die Fluoreszenzeigenschaften, was wiederum an der Ähnlichkeit der Fluoreszenz- und Excitationsspektren dieser Proteine mit den Spektren von freiem Tyrosin in Lösung ersichtlich ist.

Eine Phenylalaninkomponente wurde in den Fluoreszenzspektren der Proteine bisher noch nicht gefunden, vielleicht wegen des relativ niederen Absorptionskoeffizienten und der geringeren Lichtausbeute dieser aromatischen Aminosäure.

Die ersten Fluoreszenzpeaks in den Spektren unbenutzter normhaut fanden sich bei 335 bis 340 nm, wenn bei 290 bis 295 angeregt wurde (Abb. 5). Nach UDENFRIEND's Angaben fällt das Fluoreszenzmaximum von gebundenem Tryptophan in den Wellenlängenbereich von 320 bis 350 nm, falls

zwischen 290 und 295 nm angeregt wird. Tyrosin dagegen zeigt in diesem Anregungsbereich eine geringere Absorption. KATLENHOFFER fand in Hautkeratinen beachtliche Tyrosin- und Tryptophanmengen. Dies berechtigt zu der Annahme, daß Tryptophan einen nicht geringen Anteil an der RFI des ersten Peaks hat. Da die Wellenlänge 280 nm, bei der die KFES gestartet wurden, dem Beginn des Anregungsoptimum von Tyrosin entspricht, könnte diese Aminosäure an der kurzwelligen Schulter des ersten Peaks maßgeblich beteiligt sein. Folglich scheinen an der Fluoreszenz des ersten Peaks sowohl Tyrosin als auch Tryptophan teilzuhaben.

Die Fluoreszenzintensität des stratum corneum hängt davon ab, in welcher Konzentration einerseits die aromatischen Aminosäuren, andererseits die zwar absorbierenden, aber nicht fluoreszierenden freien Aminosäuren im gemessenen Hornschichtanteil vertreten sind.

Nach der Wasserextraktion wurde in allen Spektren eine auffallende RFI-Erhöhung im Wellenlängenbereich des ersten Peaks registriert (Abb. 6). Bei den verschiedenen Versuchsreihen lag sie zwischen 160 und 343 %. Da bei der Wasserelution neben Zuckerverbindungen hauptsächlich Aminosäuren herausgelöst werden, muß im Verschwinden dieser fluoreszenzlöschenden Substanzen die Ursache für die auffallende Zunahme der RFI gesucht werden.

Als weiteren Vertreter mit fluoreszenzlöschendem Charakter kann man die Urocaninsäure ansehen. Nach ZELISEK und KRAL ist sie als führendes UV-Chromogen zu betrachten. PRATZEL gibt ihr Absorptionsmaximum bei einem pH von 5,5 bei 265 nm an, ins Langwellige erstreckt sich ihr Absorptionsbereich bis 310 nm. Die Urocaninsäure ist leicht wasserlöslich und es ist anzunehmen, daß sie nach einer Wasserelution vollständig aus der Hornhaut entfernt ist.

Der Grund für die fluoreszenzlöschende Wirkung dieser Substanzen kann in einem "inneren Filtereffekt",

den sog. Quenchingvorgängen, liegen. Hierbei absorbiert irgendeine Substanz das Anregungslicht, welches dann für die Anregung fluoreszierender Verbindungen verloren geht.

Die Urocaninsäure und die anderen freien nicht-aromatischen Aminosäuren absorbieren die Anregungsstrahlung in so hohem Maße, daß bei ihrer Anwesenheit die Intensität des Excitationslichtes weit herabgesetzt ist. Erst nach ihrer Extraktion ist die Anregungsstrahlung genügend stark für die weiteren absorbierenden und fluoreszierenden Inhaltsstoffe der Hornhaut, sodaß sich als Effekt eine KFI-Zunahme um das doppelte bis dreifache einstellt.

Im Bereich des zweiten Peaks der wassereluierten Hornschicht, der bei Excitationswellenlängen von 345 bis 348 nm und Fluoreszenzwellenlängen von 450 bis 440 nm aufgefunden wird, ist die KFI um 5 bis 44 % herabgesetzt. Anscheinend werden bei der Wassereextraktion auch Substanzen herausgelöst, die bei der unbehandelten Hornhaut zur Fluoreszenz des zweiten Peaks beitragen.

Bei der Wassereextraktion, deren Ergebnis in Abb. 5 als Peak 1 erscheint, handelt es sich um einen Schnitt, bei dem der Anregungsmonochromator statt wie gewöhnlich (Peak 2 in Abb.5) bei 280 nm bereits bei 265 nm gestartet wurde. Eine optimale Einstellung war mit diesem KFE-Spektrum offensichtlich nicht erreicht, denn wenn man mehrere Schnitte durch den Fluoreszenzbereich legt, findet man einerseits ein Maximum von Excitation und Fluoreszenz bei etwa 265/460-470, andererseits bei 365/420. Wenn also die Anregung des ersten Peaks nach Wassereelution bei 265 nm möglich ist (vorher 290 nm), so vermutlich deshalb, weil in diesem Bereich absorbierende Verbindungen (z.B. bei 265, AS bei 280 nm) aus der Hornschicht entfernt worden sind. Eine Verschiebung der Fluoreszenzbande von 440-450 vorher auf 460-470 ist in Anbetracht der breiten Fluoreszenzbanden möglicherweise im Bereich der Ablesegenauigkeit und

demzufolge nicht sehr stark zu bewerten. Für den zweiten Peak bleiben andererseits die qualitativen Daten nach Was-serelution etwa erhalten.

Nach der Acetonextraktion läßt sich im Bereich des ersten Peaks überwiegend eine relative Fluoreszenzintensitäts-Abnahme feststellen, während der zweite Peak bei allen Versuchen an Höhe gewinnt.

Nach der Ätherextraktion verliert der erste Peak, von einer Ausnahme abgesehen, geringfügig an Höhe. Beim zweiten Peak ist hier in einem Fall ein erheblicher Anstieg und in zwei Fällen kaum eine Veränderung zu erkennen (Abb.6). Zusammengefaßt wirkt sich die Lipidextraktion, unabhängig, ob mit Aceton oder Diäthyläther durchgeführt, im ersten Peakbereich fluoreszenzlöschend, im zweiten fluoreszenzfördernd aus. Aus Absorptionsmessungen lipidhaltigen Hornhautextraktes, der mit Dichlormethan von der Unterarmbeugeseite gewonnen wurde, ergaben sich folgende Daten: Das Absorptionsmaximum der Hornschichtlipide liegt bei der Wellenlänge 310 nm. Die Anregung für den ersten Fluoreszenzpeak liegt nach meinen Aufzeichnungen zwischen 286 und 289 nm. Die Absorption von lipidhaltigem Hornhautextrakt beträgt in diesem Bereich etwa noch ein Drittel der maximalen Absorption.

Im zweiten Peakbereich wird die Fluoreszenz nach Lipidextraktion bei den Wellenlängen 325-335 nm optimal angeregt (Abb.5). Bei diesen Wellenlängen wird das Anregungslicht von den Hornhautlipiden noch in hohem Maße absorbiert und bei 395-410 nm teilweise als fluoreszenzlicht emittiert.

Da im Bereich des ersten Fluoreszenzgipfels lipidextrahierte Hornhaut eine geringere RFI als lipidhaltige Hornhaut aufweist, läßt sich auf eine maßgebliche Beteiligung der Lipide an der Fluoreszenz bei 325-330 nm schließen. In einigen Fällen steht die Auswirkung der Lipidextraktion auf die RFI in keinem Verhältnis zu den

Absorptionseigenschaften der Lipide bei den entsprechenden Wellenlängen. Scheinbar wird nur ein Teil des absorbierten Lichtes von ihnen in Fluoreszenzlicht transformiert und davon wieder nur ein Teil als meßbare Fluoreszenzstrahlung abgegeben. Wie bei den Aminosäuren ist auch hier der Grund für den Verlust der Fluoreszenzenergie in den Quenching-Vorgängen zu suchen, bei denen, durch einen inneren Filtereffekt bedingt, das angeregte Molekül das Excitations- bzw. auch Fluoreszenzlicht zwar absorbiert, die aufgenommene Energie jedoch nicht in Form von Licht abgibt. Auf diese Weise ist das Mißverhältnis der teilweise hohen Absorption der Lipide bei den Anregungswellenlängen zu dem meist nur geringen Absinken der RFI nach Entfernung der Lipide erklärbar.

Der zweite Fluoreszenzpeak steigt nach Extraktion der Lipide um durchschnittlich 42 % an. In diesem Wellenlängenbereich wirkt die Anwesenheit der Lipide fluoreszenzlöschend. Aus dem deutlichen Anstieg der RFI nach Lipidextraktion ist zu schließen, daß die Lipide im zweiten Peakbereich zwar noch stark absorbieren, zur RFI des zweiten Peaks aber nichts beitragen.

Nach der Entfernung der Lipide kann der sonst von ihnen absorbierte Teil der Excitationsstrahlung von der übrigen Hornhaut, bei der es sich jetzt nur noch um das Keratingerüst handelt, absorbiert werden. Das bisher durch die Lipidabsorption herabgesetzte Anregungslicht nimmt für den Hornschichtrest zu. Für die nach der Extraktion der freien Aminosäuren und der Lipide registrierte RFI sind die unlöslichen Teile der Hornschicht verantwortlich, die nach STÜTTGEN 50 bis 55 % des stratum corneum ausmachen, bestehend aus dem harten Keratin A und dem weichen Keratin B. Als fluoreszierende Substanzen bleiben die Inhaltsstoffe des Keratingerüsts. Darunter fallen vor allem die Proteine mit ihrem hohen Gehalt an aromatischen Aminosäuren. Die Excitationsstrahlung war bisher

durch die Anwesenheit absorbierender fluoreszenzlöschender Stoffe und der löslichen Lipide, die das Keratin umgeben, herabgesetzt. Nach der Lipidextraktion kann das Keratingerüst die vermehrt angebotene Anregungsstrahlung in vollem Umfang absorbieren und, soweit die Fluoreszenzeigenschaften der Keratinsubstanzen es möglich machen, als Fluoreszenzlicht emittieren.

Die prozentual teilweise differierenden Ergebnisse der Meßversuche können durch verschiedene Faktoren bedingt sein. Unter den apparativen Veränderungen, mit denen man von Versuch zu Versuch und auch während einzelner Messungen rechnen muß, sind besonders die Lichtbogenschwankungen der Xenonlampe hervorzuheben.

Das Hornhautmaterial stammte von verschiedenen Rückenhautstellen der Versuchsperson; die Durchmesser der einzelnen Stücke sind nicht bekannt. Die vielleicht verschiedene Stärke des Materials kann zu Verschiebungen der Fluoreszenzergebnisse beigetragen haben.

Bei der Hornhaut, die zur Messung kam, handelte es sich durchwegs um UV-bestrahltes Material. Nach HORACEK und ČERNÍKOVA, die die Haut einer ganzen Reihe von physikalischen Einflüssen aussetzten, übt die UV-Strahlung auf die Hautlipide eine Wirkung aus, die das Lipidgemisch betrifft. Es ist anzunehmen, daß die Hornschichtteile aus dem Randbezirk der UV-bestrahlten Hautregion diesem Einfluß weniger unterlegen waren, sodaß man auch deshalb mit einem Qualitätsunterschied des Materials rechnen muß.

Bei den letzten Meßversuchen war das Hornschichtmaterial etwa drei Monate alt. Bakterienwachstum und Bildung von Zersetzungsprodukten ist wahrscheinlich, obwohl auch bei mehrfacher Vergrößerung keine Veränderungen oder Auflagen erkennbar waren.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

In vorhergehenden Dissertationsarbeiten war über die Fluoreszenzeigenschaften der menschlichen Hautoberfläche und über die Veränderungen der Fluoreszenzintensität als Reaktion der Epidermis auf verschiedene Einflüsse berichtet worden. Diese Meßergebnisse warfen die Frage auf, wie weit die einzelnen Epidermisschichten an der Hautoberflächenfluoreszenz beteiligt waren. Aus mehreren dargelegten Gründen lag es nahe, zuerst die Fluoreszenzcharakteristika der periphersten Hautoberflächenschicht, des stratum corneum, zu untersuchen.

Da die Hornschicht zur Fluoreszenzmessung in Stücken von ca 2 x 5 cm vorliegen mußte, war eine besondere Methodik zum Ablösen der Hornhaut von den tieferliegenden Schichten erforderlich. Der Rücken einer Versuchsperson wurde solange einer UV-Bestrahlung ausgesetzt, bis sich die Hornhaut nach einigen Tagen stellenweise vom stratum granulosum abhob.

Von der isolierten Hornschicht wurden kombinierte Excitations-Fluoreszenzspektren aufgezeichnet, die in einem Arbeitsgang das Anregungs- und das Fluoreszenzoptimum erfaßten. Um über die Fluoreszenzeigenschaften der einzelnen Hornschichtsubstanzen aussagen zu können, wurden diese mit geeigneten Lösungsmitteln extrahiert. Gemessen wurden Excitation und Fluoreszenz vor und nach dem Herauslösen der wasserlöslichen Inhaltsstoffe, ebenso nach der Extraktion der Lipide.

Die kombinierten Excitations-Fluoreszenzspektren wiesen ausnahmslos zwei Fluoreszenzpeaks auf. Die Extraktion mit Wasser und Fettlösungsmitteln bewirkten eine Verlagerung der Fluoreszenzoptima in Richtung kurzwelliger Bereich. Als Veränderungen der relativen Fluoreszenzintensität (I_{rel}) bei Vergleichen der extrahierten Hornschicht mit der unbenutzten ist folgendes festzustellen: Nach Entfernung des wasserlöslichen (WL) steigt der erste Peak

um 160 bis 340 % an. Nach Acetonextraktion der Lipide nimmt er um 13 bis 38 % ab, nach anschließender Diäthylätherextraktion noch einmal um 7 bis 8 %.

Der zweite Peak zeigt ein gegenteiliges Verhalten. Nach Extraktion des WL sinkt er um 5 bis 44 % ab. Lipidextraktion mit Aceton hat im zweiten Peakbereich eine RFI-Zunahme von 21 bis 100 % zur Folge, nach einer anschließenden Extraktion der Lipide mit Diäthyläther ist ein weiterer Anstieg der Fluoreszenzintensität zu verzeichnen. Berücksichtigt man die Absorptionseigenschaften und die teilweise in der Literatur beschriebenen Fluoreszenzcharakteristika der Hornschichtsubstanzen, können aus den Ergebnissen der Fluoreszenzmessungen folgende Schlüsse gezogen werden:

Das Zustandekommen des ersten Fluoreszenzpeaks der unbehandelten Hornschicht ist mit dem Gehalt an fluoreszierenden aromatischen Aminosäuren zu erklären. Eine Hauptrolle im Fluoreszenzverhalten der Hornhaut scheint dem Tryptophan, eine fast ebenso wichtige dem Tyrosin zuzukommen.

Die auffallende RFI-Erhöhung im ersten Peakbereich nach Extraktion des WL hat ihre Ursache wahrscheinlich in der Entfernung der fluoreszenzlöschenden Inhaltsstoffe. Zu diesen zählen die Urocaninsäure und verschiedene nichtaromatische Aminosäuren, die die Exzitationsstrahlung zwar in hohem Maße absorbieren, diese jedoch in eine andere Energieform umwandeln und sie deshalb nicht in Form von Fluoreszenzstrahlung emittieren. Nach dem Herauslösen dieser Stoffe steht für die fluoreszierenden Bestandteile mehr Anregungslicht zur Verfügung.

Die RFI-Abnahme im zweiten Peakbereich läßt erkennen, daß das WL zur Fluoreszenz der intakten Hornhaut einen nicht geringen Teil beigetragen haben muß.

Die fluoreszenzlöschende Wirkung auf die Intensität im ersten Peakbereich nach Lipidextraktion weist

den Lipiden einen maßgeblichen Anteil am Fluoreszenzgeschehen des stratum corneum zu.

Der Anstieg des zweiten Peaks nach Lipidentfernung kann so gedeutet werden, daß die Lipide die in diesem Wellenlängenbereich von ihnen absorbierte Anregungsenergie statt in Fluoreszenzlicht in eine andere Energieform umwandeln. Da nach der Lipidextraktion den fluoreszierenden Keratinsubstanzen mehr Anregungsstrahlung angeboten wird, kann ein deutlicher Anstieg der RFI beobachtet werden.

VII. LITERATUR

- APFELINGER, A.: Experimentelle Untersuchungen zum Fluoreszenzspektrum der menschlichen Haut.
Med.Dissertation Universität München 1971
- BLOCH, K.: Biogenesis and transformation of squalene.
In: Biosynthesis of terpenes and sterols.
Ciba Foundation Symposium, Boston 1959
- BADER, R.P.: Studies of epidermal protein Metabolism.
J.Invest.Dermat. 39: 400 (1962)
- CARMUTHENAS, C.: Biochemistry of skin in health and disease.
New York 1962
- CRITICAL TABLES of numerical data, physics, chemistry
and technology. New York & London 1933
- EDLACHER, K.u.HETZ, G.: Zur Kenntnis der Urocaninsäure.
Hoppe-Seyler Z.f.Physiol.Chem. 279 (1943)
- HELMANN, F. et al.: Untersuchungen der Lipide in verschiedenen Bezirken der Hautoberfläche. Hautarzt 11: 8, 60
- HORACER, J., M. CHAMIROVA: Chromatographie der Lipide auf Glasfaserpapier. Arch.klin.exp.Derm. 209: 572 (1969)
- JACOLI, O.: Die Inhaltsstoffe des normalen Stratum corneum und Callus der menschlichen Haut.
Arch.klin.exp-Derm. 233: 383 (1969)
- JORDAN, F.: Kurzes Lehrbuch der Dermatologie. München 1902
- JADASSOHN, M.u.F.SCHAAF: Bemerkungen über das Eindringen gewisser Stoffe in die Haut.
Dermatologica 140: 275 (1970)
- KLIGMAN, A.M.: The Uses of Sebum
Brit.J.Dermat. 75: 307 (1963)

- KOOYMAN, D.J.: LXI Lipids of the skin. Some changes in the lipids of the epidermis during the process of keratinisation.
Arch.Dermatol.Syphilol. 25: 444 (1932)
- LEONARDI, G., L. LOHNER, J. GORDON: Untersuchungen zur Charakterisierung der löslichen epidermalen Proteine.
Arch.klin.exp. 237: 662 (1970)
- LIEBREICH, O.: Über das Vorkommen des Lanolin im menschlichen Organismus.
Arch.Pathol.Anat.Physiol. 121: 365 (1890)
- MARZULLI, F.: Barriers to skin penetration.
J.Invest Dermatol. 39: 387 (1962)
- MATOLTSY, G.: Neuere Ansichten über die Keratinisation.
Proc.Internat.Congr.Dermat.Washington 1962
- MENCKEN, E.H.: Keratin and Keratinization
Pergamon Press, New York 1961 a-e
- MÖTING, D., H. LANGHOR, V. WORTMANN: Die Aminosäurezusammensetzung gesunder, menschlicher Haut.
Z.klin.Med. 152: 495 (1955)
- PASCHER, G.: Cis-u.trans-Urocaninsäure als Bestandteil des stratum corneum.
Arch.Klin.exp.Derm. 214: 234 (1962)
- PINKUS, H.: Examination of the epidermis by the strip method. II. Biometric data on regeneration of the human epidermis.
J.Invest.Dermatol. 19: 431 (1952)
- REITZEL, H.: Biochemische Vorgänge an der menschlichen Autoepitheliale.
Nat.Dissertation Technische Universität München 1969

- FRATZEL, H.: Spektralfluorometrie der menschlichen
Hautoberfläche. Teil I:
Ein neuer Hautspektralfluorograph.
Persönliche Mitteilung
- RUSSLER, G.: Untersuchungen zum Stoffwechsel der Epidermis-
zellen. Arch.klin.Derm. 223: 425 (1969)
- RAPPENHOFER, M., E.SCHAUENSTEIN, W.BERNDT: Histochemische
und UV-spektrographische Untersuchungen an
menschlichen Hautkeratinen
Z.f.Biologie 104: 384 (1951)
- REINERTSON, A.P.u.V.R.WHEATLEY: Studies on the chemical
composition of human epidermal lipids.
J.Invest Dermatol. 32: 49 (1959)
- SCHAAF, F.u.F.GROSS: Die Reaktion der Haut gegenüber
äußerlich applizierten Stoffen.
Dermatologica 106: 170 (1953)
- SCHWARZ, E.: Säurelösliche, UV-absorbierende Verbindungen
der Epidermis des Meerschweinchens
Arch.klin exp.Derm. 228: 179 (1967)
- SCHWARZ, E.u.G.KLOSS: Freie Aminosäuren und zugehörige Sub-
stanzen in abschabbarer Hornschicht unbefalle-
ner Psoriatikerhaut.
Arch.klin.exp.Derm. 231: 311 (1968)
- SCHWARZ, E.: Abbau von Histidin zu Urocaninsäure in der
Epidermis. Biochem.Zeitschr. 334: 415 (1961)
- SOBEL, H.u.J.MAIMONSTON: The possible role of squalene as
a protective agent in sebum.
Cancer Res. 16: 500 (1956)
- SPIER, H.W.u.G.PASCHER: Freie Aminosäuren an der Hautober-
fläche. Arch.Dermatol.Syphil. 200: 59 (1955)

- SPIER, H.W. u. G. PASCHER: Physiologie der Hautoberfläche
Act. Probl. Derm. 1: 1 (1959)
- SPIER, H.W. u. G. PASCHER: Die wasserlöslichen Bestandteile
der peripheren Hornschicht. Quant. Analysen.
VI. Das Substrat der UV-Absorption des Wasser-
löslichen. Arch. klin. exp. Derm. 209: 181 (1959)
- SPIER, H.W.: Hornschichtphysiologie als gewebedermato-
logische Grundlagenforschung.
Berufsdermatosen 15: 121 (1967)
- STUTTGEL, G.: Die normale und pathologische Physiologie
der Haut. Stuttgart 1965
- SWANBECK, G. and N. THYRESSON: A study of the state of
aggregation of the lipids in normal and in
psoriatic horny layer.
Acta Dermato-Venereol. 42: 445 (1962)
- SZAKALL, A.: Über den Verlust und Nachschub der hygroskopen
wasserlöslichen Inhaltsstoffe in der Horn-
schicht beim lebenden Menschen.
Arch. klin. exp. Derm. 206: 374 (1957)
- SZAKALL, A.: Biologie der Hautoberfläche.
Proc. II. Internat. Congr. of Dermat. Stockholm
2: 23 (1960)
- TABACNIK, J. and J. H. LABADIE: Studies on the biochemistry
of epidermis. Radiat. Res. 11: 684 (1959)
- UDENFRIEND, S.: Fluorescence Assay in Biology and Medicine
Vol. II Academic Press New York 1969
- UNNA, P. G.: Beiträge zur Histologie und Entwicklungsgeschichte
der menschlichen Oberhaut und ihrer Anhangsgebilde
Arch. Mikrosk. Anat. Entwicklungsmech. 12: 665 (1876)

UNNA, P.G.: Zur feineren Anatomie der Haut
Klin.Wschr. 58: 447 (1921)

WAHL, S.: Histochemische Untersuchungen über Vorkommen
und Lokalisation der Lipide in der Haut.
Arch.Dermat.u.Syph. 154: 286 (1928)

HEATLEY, V.R. and E.M.FARBER: Studies on the chemical
composition of psoriatic scales.
J.Invest.Dermatol. 36: 199 (1961)

WITTELS, A., G.VAN HAM, A.MLAZOG: Künstlicher Lichtschutz.
II.Untersuchungen zur Wirksamkeit abgeschwächter
UV-Strahlen.
J.Soc.Cosmetic Chemists 20: 743 (1969)

ZELICKSON, A.S. and J.P.HARRMAN: An electron microscopic
study of human Epidermis.
J.Invest.Dermatol. 36: 65 (1961)

ZELISER, A., J.A.ARAL, I.M.HUIS: sun-screening effect of
urocanic acid.
Medical School, Charles University, Prague 1955

Herrn Dr.H.PRAETZEL danke ich für die Überlassung des
Themas. Er stand mir bei der Abfassung der Arbeit mit
immer neuen Anregungen und seinem wertvollen Rat stets
hilfreich zur Seite.

Ebenso sei Herrn Prof.H.DREXEL an dieser Stelle für
seine freundliche Unterstützung gedankt.

Für die Übernahme des Korreferates bedanke ich mich bei
Herrn Prof.J.LISSNER.

Um die technische Durchführung der Arbeit haben sich
Frau Schrammek, Frl.RÜCKER, Frau WOLF, Herr TAFFERNER
und Herr SCHLIER verdient gemacht.

LEBENS LAUF

Am 12.9.1942 wurde ich als fünftes Kind meiner Eltern Erich Radtke, Oberstleutnant der Gendarmerie und Hedwig Radtke, geb. Schulz, in Berlin geboren. Die Volksschule besuchte ich ab 1948 in Schondorf am Ammersee, das Humanistische Gymnasium ab 1952 in München. 1961 legte ich im Luisengymnasium in München die Reifeprüfung ab und begann mit dem Medizinstudium an der Universität München. 1963, 1965 und 1968 bestand ich Vorphysikum, Physikum und Staatsexamen. Nach der in München abgeleisteten Medizinalassistentenzeit erhielt ich 1970 die Approbation. Nach einjähriger Assistentenzeit im Institut für medizinische Datenverarbeitung wandte ich mich der Fertigstellung meiner Dissertationsarbeit zu.

